

俄罗斯大果沙棘组织培养技术研究^{*}

康冰¹, 张广军², 吕月玲², 李文华³, 张小红¹, 张金学⁴, 曹建军¹

(1 西北农林科技大学 生命科学学院; 2 资源环境学院; 3 林学院, 陕西 杨陵 712100; 4 甘肃省天祝县林业局, 甘肃 天祝 733200)

[摘 要] 主要以俄罗斯大果沙棘良种“优胜”的休眠枝茎段、幼嫩茎段为外植体, 诱导形成不定芽及愈伤组织, 同时对其他大果沙棘也进行了相关组织培养试验。结果表明, 在诱导不定芽时, 以休眠枝茎段为外植体, 不定芽发生数量多, 易获得无性系植株; 基本培养基以 $1/2MS$ 较好, 继代培养以 $1/3MS$ 为佳; 最佳接种时间为3月份; 初接种培养基为 $1/2MS + 6-BA 1.0 mg/L + IAA 0.5 mg/L$; 愈伤组织诱导分化培养基为 $1/3MS + KT 0.3 mg/L + NAA 0.03 mg/L$; 增殖培养基为 $1/3MS + 6-BA 0.5 mg/L + NAA 0.2 mg/L$; 生根培养基为 $1/4MS + NAA 0.03 mg/L + BA 0.1 mg/L$ 。

[关键词] 大果沙棘; 组织培养; 愈伤组织

[中图分类号] Q943.1

[文献标识码] A

[文章编号] 1671-9387 (2002) 06-0162-05

沙棘 (*Hippophae rhamnoides* L.) 为胡颓子科 (Elaeagnaceae) 沙棘属 (*Hippophae* Linn) 植物, 雌雄异株, 具有良好的防风固沙、保持水土、改善环境等作用, 其果实具有很高的营养价值^[1], 是一种集社会效益、生态效益、经济效益于一身的珍贵树种。用沙棘种子繁殖, 后代易发生变异, 而无性繁殖不仅可以保持母本的优良性状, 而且可以提前成熟1~2年。随着沙棘资源建设的加快, 对优良种苗的需求量也急剧增加, 沙棘的快速繁殖已成为非常重要的研究课题。

沙棘无性繁殖通常采用的方法是幼苗扦插及根蘖繁殖, 但存在成苗率低、速度慢等缺点。利用组织培养可以加速繁殖生产中急需的一些具有抗旱、抗寒、抗盐碱、抗沙埋、抗病虫、综合性状好、产量高、大果无刺等特殊用途的新品系, 而且利用沙棘组织培养物或细胞培养物作为生产沙棘药物的原料可以为沙棘工业带来新的开发途径。

沙棘组织培养研究已有文献报道^[2~6], 但主要是针对中华沙棘进行的相关研究。本研究报道了俄罗斯大果沙棘良种的组培新技术, 以期对种苗的快速繁殖推广提供参考。

1 材料与方法

1.1 外植体准备

试验材料来源于1999年引进的俄罗斯大果沙

棘良种“优胜”。分别采用成年和幼年植株茎段, 剪取6 cm左右带有腋芽的短枝, 放入烧杯中用自来水、肥皂水、蒸馏水依次清洗, 然后装入消毒瓶中。先用体积分数70%酒精消毒30 s, 再用质量分数0.1%的 $HgCl_2$ 溶液消毒6~12 min; 外植体为嫩茎(3~4月份采)和叶片时的消毒时间约4~8 min, 最后用无菌水冲洗4~5次。此外, 对其他大果沙棘品种材料也适度采集接种后进行对比试验。

1.2 培养基和培养条件

以 MS , $1/2MS$, $1/3MS$, $1/4MS$ (大量元素分别降低) 为基本培养基, 分别加入不同质量浓度的 IAA , NAA , BA , $2, 4-D$, $6-BA$ 和 KT 。诱导不定根时, 以 $1/2MS$ 为基本培养基加入不同质量浓度的 BA 和 NAA 。每处理中加蔗糖30 g/L, pH值5.8, 琼脂6.0 g/L。培养温度为 $(22 \pm 2)^\circ C$, 每日光照11 h, 光照度1500 lx。

2 结果与分析

2.1 适宜接种时间的选择

从10月至翌年5月取外植体接种培养, 发现不同取材时间的腋芽萌发成芽能力有很大差异, 结果见表1。由表1可见, 4月份采的材料, 接种后外植体萌发率可达90%以上, 但极易受细菌污染, 芽的长势不如2~3月份采的材料。在3月份取材, 外植体萌发率可达100%, 发芽时间4~5 d, 发芽后生长

^{*} [收稿日期] 2001-12-25

[基金项目] 国家外专局引智项目资助 (006100028)

[作者简介] 康冰 (1969-), 男, 陕西礼泉人, 助理研究员, 主要从事经济及水保植物快繁工作。

快, 茎叶粗大, 健壮, 培养 15 d 芽长达 2.5 cm 左右, 用以继代培养可实现快繁目的。在 5 月以及 9 月至翌年 1 月取材, 外植体都极易被污染, 腋芽极难萌发, 个别发芽后生长缓慢, 难以抽枝成茎。6~8 月取材, 接种的外植体褐化严重, 腋芽萌发困难。由此可见, 最适接种时间为 3 月份。

表 1 不同接种时间对芽生长的影响

Table 1 Effect of different inoculation time on the growth of buds

外植体采集时间/月 Time of explants	接种数 Number of inoculated explants	萌发时间/d Time of gemination	萌发率/% Percent of gemination	萌发 10 d 的生长量/cm Growth after 10 days	萌发 15 d 的生长量/cm Growth after 5 days	备注 Remarks
9~11	40	7~8	50	0.5	1.0	污染率高, 生长快 High rates of pollution, growing rapidly
12~1	40	9~10	50	0.5	1.0	生长慢 Growing slowly
2	40	7~8	80	1.3	2.1	需解除休眠时间 Need to relieve the dormancy
3	45	4~5	100	1.5	2.5	萌发早, 生长快 Geminating early and growing rapidly
4	45	4~5	90	1.0	1.8	污染较高 High rates of pollution
5	39	7~8	40	0.3	0.8	污染率高, 易玻璃化 High rates of pollution, facilitating the vitrification
6~8	84	10~14	8.4	0.2	0.4	褐化严重, 萌发难 Serious brawn change and difficult gemination

2.2 培养基的筛选

2.2.1 基本培养基的筛选及对芽生长的影响 为了得到最适的培养基, 进行了不同基本培养基中外植体腋芽生长对比试验 (表 2)。

表 2 基本培养基对芽生长的影响

Table 2 The effect of basic medium on the growth of buds

基本培养基 Basic medium	接种外植体数 Number of explants	萌发 15 d 的生长量/cm Growth after 15 days	平均每个外植体分化数 Average No. of regeneration shoots per explant	备注 Remarks
MS	40	2.0	1.0	后期茎尖变褐死亡 Shoots change brown and die at later stage
1/2MS	40	2.5	2.1	长势最好 The status of growth is the best
1/3MS	40	1.8	1.5	长势较好 The status of growth is better
1/4MS	40	1.5	2.5	长势慢 The status of growth is slow

在附加物 (6-BA 0.5 mg/L, IAA 0.2 mg/L) 相同的 MS, 1/2MS, 1/3MS, 1/4MS 上培养 15 d, 从苗高度及产生不定芽个数看, 1/2MS 优于其他基本培养基, 芽不仅长势较快, 且茎叶粗大, 健壮, 萌发成丛生芽。在 MS 培养基上, 芽前期长势较快, 但后期茎尖易褐化, 继而枯死, 无机盐浓度降低时, 茎生长减慢。

2.2.2 激素对初接种外植体生长的影响 以分别含质量浓度为 0.2, 0.3, 0.5, 0.7, 1.0, 1.5, 2.4 mg/L 6-BA 并同时附加质量浓度为 0.2 mg/L IAA 的培养基进行接种试验, 结果表明, 对于 3 月份刚解除休眠的两年生茎段较好, 芽萌发早, 长势旺盛, 叶片较大, 茎较粗, 当茎高≥3 cm 时, 可切下芽苗进行增殖培养及生根培养; 而对于当年生

幼嫩茎段, 6-BA 质量浓度为 0.2 mg/L 时生长较好, 质量浓度过高易使外植体产生玻璃化而死亡。

初培养过程各生长素试验筛选后表明, IAA 对生长分化最为有利, 当培养基中分别含有 0.05, 0.1, 0.2, 0.5 mg/L IAA 且与 0.5~4 mg/L 6-BA 配合施用, 质量浓度在 0.2~0.5 mg/L 时对芽有利, 芽生长迅速。

高等植物的每个叶腋中都有隐芽存在, 在一定条件下可使其萌发, 形成芽丛^[7], 提高无性系材料的获得率, 从而达到快繁目的。以 1/2MS 为基本培养基, 附加不同质量浓度 6-BA, IAA 进行最佳组合筛选, 培养 20 d 后, 对芽的萌发率、长势、愈伤组织诱导、芽增殖进行调查, 结果见表 3。

表 3 植物激素对腋芽增殖生长的影响

Table 3 Effect of hormones on proliferation of tube-plantlets

激素/(mg·L ⁻¹) Hormones				处理数 Number of treatment	20 d 平均苗高/cm Average height of shoots after 20 days	平均每腋芽萌发不定芽数 Average No. of spouted shoots per tube-plantlet
6-BA	KT	NAA	IAA			
4			0.2	24	2.5	1.1
1			0.5	17	2.0	2.9
	1	0.2		20	2.1	1.5
0.5			0.5	32	1.9	2.6
1		0.2		15	1.7	1.1

由表 3 可见, 在不同激素的组合配比试验中, 培养 20 d 对芽的增殖效果差异显著。在 1/2MS + 6-BA 4 mg/L + IAA 0.2 mg/L 时, 芽增长较快, 但多数为单茎生长, 少有分枝, 繁殖倍数低, 芽增殖效果比较差; 在 1/2MS + KT 1 mg/L + NAA 0.2 mg/L 中也多为单茎生长, 少有分枝, 增殖效果不太明显; 在 1/2MS + 6-BA 0.5~1 mg/L + IAA 0.5 mg/L 时, 苗的长势较快, 苗叶色绿, 苗形正, 茎粗壮, 产生的小分枝较多, 繁殖系数较高。结果表明, 0.5 mg/L IAA 与 0.5~1.0 mg/L 6-BA 混

合施用, 出芽率较高, 且可萌发出丛生芽, 生长较快。当 6-BA 大于 1.0 mg/L 时, 其外植体上较易形成愈伤组织, 但后期变褐死亡。由此可见, 腋芽增殖阶段起始培养以 1/2MS + 6-BA 1.0 mg/L + IAA 0.5 mg/L 为最好。

2.2.3 激素对愈伤组织诱导分化的影响 笔者在对愈伤组织的诱导中发现, 用 1/2MS, 1/3MS 可以诱导沙棘无性系幼芽、叶片及幼茎产生愈伤组织, 但由于所附加激素的质量浓度不同, 愈伤组织的产生和增殖速度等也不同。结果见表 4。

表 4 不同激素对愈伤组织分化诱导的影响

Table 4 The effect of different hormones on inducement of calluses

培养基 Medium	激素/(mg·L ⁻¹) Hormones				外植体数 Number of explants	诱导率/% Ratio of bud inducement	死亡率/% Ratio of death	愈伤组织生长发育状况 Development and growth of callus
	IAA	NAA	6-BA	KT				
1/2MS	0.2		1		30	80	50	后期易变褐死亡 Changing brown and dying at later stage
1/2MS		0.2	1		16	15	5	长势缓慢 Growing slowly
1/3MS		0.03		0.2	30	80	5	增长分化较快 Inducing rapidly
1/3MS		0.03		0.3	35	80	8	增长分化较快 Inducing rapidly
1/3MS		0.1	0.5		20	60	15	后期易变褐死亡 Changing brown and dying at later stage

由表 4 可以看出, 当 IAA 为 0.2 mg/L, 6-BA 为 1 mg/L 时或在 1/3MS + 6-BA 0.5 mg/L + NAA 0.1 mg/L 培养基中, 愈伤组织诱导率高, 但 20 d 时均易变褐死亡。当愈伤组织转到 6-BA 质量浓度 ≤ 0.5 mg/L 的培养基中, 愈伤组织将会增长。

在 1/3MS + KT 0.2~0.3 mg/L + NAA 0.03 mg/L 中, 诱导率可达 80%, 死亡率低, 生长较快。

2.3 继代培养和愈伤组织诱导分化

将初培养获得的无性系材料转至继代培养基上, 培养结果见表 5。

表 5 继代培养与愈伤组织诱导分化

Table 5 Subculture of buds and inducement of calluses

培养基 Medium	外植体个数 Number of inoculated buds	产生愈伤组织数 Number of callus induced	愈伤组织生长与发育状况 Development and growth of callus
1/2MS + 6-BA 1 mg/L + IAA 2 mg/L	15	6	初期生长快, 后期逐渐死亡 Growing rapidly at initial stage, dying gradually at later stage
1/3MS + 6-BA 0.5 mg/L + NAA 0.2 mg/L	10	8	初期生长快, 后期生长缓慢 Growing rapidly at initial stage, growing slowly at later stage
1/3MS + KT 0.2 mg/L + NAA 0.03 mg/L	12	10	生长快, 并分化出绿色芽点 Growing rapidly, inducing green dots of buds

注: 外植体为嫩茎及叶片。

Note: Explants are stems and leaves

由表 5 可见, 沙棘无性系幼嫩芽和叶片在以上

几种培养基上容易诱导产生愈伤组织, 将幼嫩叶片

和茎段外植体接在继代培养基上, 15 d 后芽基部和叶片边缘诱导出白色颗粒状愈伤组织, 此愈伤组织不断增殖, 而原芽体停止生长或死亡, 接触培养基的叶面全部愈伤组织化。经过 40 d 左右愈伤组织可达 2.0 cm 左右, 不经转接即可在其表面出现许多深绿色圆形芽点, 继续培养分化出丛生芽, 分化出的丛生芽顶端形成完整子叶, 茎充分伸长, 20 d 后达 1.2 cm, 同时基部生成 2~3 条洁白的根, 根长 0.8 cm。

将长 1.5 cm 以上的新梢剪下, 切成 5 mm 带腋芽的小段, 转移到新的培养基上进行继代培养, 10~15 d 后当新芽高 1~2 cm 时, 又可切成小段转接, 这样一代代继续下去, 即可获得大量新芽。在继代培养中, 当新芽转入 MS 培养基中 2 周后, 茎叶并没有明显伸长, 叶片发黄, 基部褐化, 以致整体死亡; 而在 1/3MS 培养基中, 新芽生长健壮, 茎叶生长正常。

2.4 根的诱导

在试验中以 1/4MS 为基本培养基附加不同质量浓度的 NAA 和 BA, 结果表明, 当 NAA 质量浓度为 0.03 mg/L, BA 质量浓度为 0.1 mg/L 时, 苗基部产生愈伤组织, 愈伤组织上部生出根。

试验中观察到, 沙棘组培苗的生根主要有两种形式: 一是通过皮层直接生出根, 此类组培苗较易成活, 驯化期较短; 二是通过愈伤组织生根, 这种组培苗较难成活, 对驯化条件较严, 只有在合适条件下才能生长健壮且迅速。

3 结果与讨论

3.1 关于褐变预防

本试验过程中用无菌试管苗各器官继代诱导分

化, 褐变现象减少, 但用休眠枝、嫩茎、叶等作为外植体很容易出现褐变。通过试验在不加抗氧化剂的前提下, 可以通过以下几个途径降低沙棘组培过程的褐变: 降低矿质盐的浓度, 采用 1/4 或 1/3MS 基本培养基; 以所获得的无菌苗作为材料, 选取处于生理代谢减弱时期的外植体, 如休眠枝条; 接种后暗培养 10 d 后再转至光下; 将出现褐化的外植体连续转移, 会促进幼苗生长, 抵抗不利条件, 降低多酚氧化酶的活性^[4,8]; 此外, 通过试验, 6~9 月份接种时材料褐化加剧, 低温 (5℃) 处理 5 d 后, 褐变明显减轻, 外植体芽很快萌发。

3.2 繁殖倍数

繁殖倍数是植物快繁的主要目标。由于扦插繁殖受繁殖材料、扦插时间限制 (一般在 6 月初~8 月底进行) 等诸多因素影响, 繁殖倍数较低^[9]; 而茎段培养由于充分利用了繁殖材料, 实现周年操作及新生苗腋芽增殖, 有效提高了繁殖倍数; 愈伤组织诱导分化培养过程愈伤组织增殖较快, 且可分化出大量绿色胚性细胞, 进而形成丛生芽, 直接可生成根, 因此繁殖倍数大于扦插繁殖及茎段组织培养。

3.3 存在问题

试验中发现, 不同品种、树龄、部位及雄植体间外植体的差异对生长增殖影响较大。培养中虽然能形成完整的小植株, 并在扩繁培养基上可见到再生植株上有侧生根, 分株后能独立成活, 但生长速度缓慢。此外在继代培养中, 新芽生长慢, 倍数较低, 以上问题有待于进一步研究。

[参考文献]

- [1] 孙兰英, 单金友, 王春艳, 等. 沙棘组织培养基筛选试验 [J]. 沙棘, 1998, 11 (3): 14-16
- [2] 徐虹, 王俊峰, 梁宗锁. 沙棘组织培养技术研究现状及存在问题 [J]. 沙棘, 1999, 12 (1): 11-13
- [3] 李师翁, 范小峰. 大果良种沙棘愈伤组织诱导及植株再生的研究 [J]. 西北植物学报, 2001, 21 (2): 262-266
- [4] 徐虹, 梁宗锁. 沙棘组织培养技术的研究 [J]. 西北植物学报, 2001, 21 (2): 267-272
- [5] 赵国林, 刘金郎. 沙棘的组织培养和植株再生 [J]. 植物生理通讯, 1989, 25 (1): 42
- [6] 郭春华, 徐玉霞. 沙棘优良品系茎尖组织培养技术初探 [J]. 沙棘, 2000, 13 (1): 26-27
- [7] 陈正华. 木本植物组织培养及应用 [M]. 北京: 高等教育出版社, 1986. 303-310
- [8] 高国训. 植物组织培养中的褐变问题 [J]. 植物生理学通讯, 1999, 35 (6): 501-505
- [9] 杨自立, 冯忠, 侯立军, 等. 丰产大果无刺沙棘无性繁殖育苗技术研究 [J]. 林业科技通讯, 1998, 5: 16-18

Studies on tissue culture of fine variety of *Hippophae rhamnoides* L. from Russia

KANG Bing¹, ZHANG Guang-jun², LU Yue-ling², LI Wen-hua³,
ZHANG Xiao-hong¹, ZHANG Jin-xue⁴, CAO Jian-jun¹

(1 College of Life Sciences; 2 College of Resource and Environment; 3 College of Forestry, Northwest Sci-Tech University of Agriculture and Forestry, Yangling, Shaanxi 712100, China; 4 Forestry Bureau of Tianzhu County, Tianzhu, Gansu 733200, China)

Abstract: Cluster adventitious buds and calluses were induced from dormant and growing stem segments of fine variety named “YOU SHENG” of *Hippophae rhamnoides* L. from Russia. The tissue culture about other fine varieties can also be studied. The results showed that the amount of adventitious buds which were induced from dormant stem segments were more, the clone regenerated plants also were obtained easily. The basic culture medium is 1/2 MS medium, the basic multiplication medium is 1/3 MS medium. March is the best inoculation time. The inoculation medium is 1/2 MS + 6-BA 1.0 mg/L + IAA 0.5 mg/L, the callus inducing medium is 1/3 MS + KT 0.3 mg/L + NAA 0.03 mg/L, the multiplication medium is 1/3 MS + 6-BA 0.5 mg/L + NAA 0.2 mg/L, the medium for rooting is 1/4 MS + NAA 0.03 mg/L + BA 0.1 mg/L.

Key words: *Hippophae rhamnoides* L.; tissue culture; callus

本刊加入“万方数据——数字化期刊群”的声明

为了实现科技期刊编辑、出版发行工作的电子化,推进科技信息交流的网络化进程,本刊现已入网“万方数据——数字化期刊群”,所以,向本刊投稿并录用的稿件文章,将一律由编辑部统一纳入“万方数据——数字化期刊群”,进入因特网提供信息服务。凡有不同意见者,请另投他刊或特别声明需另作处理。本刊所付稿酬包含刊物内容上网服务报酬,不再另付。

“万方数据——数字化期刊群”是国家“九五”重点科技攻关项目。本刊全文内容按照统一格式制作,读者可上网查询浏览本刊内容,并征订本刊。

《西北农林科技大学学报 (自然科学版)》编辑部

2002 年 12 月

(屈李纯 供稿)